

Publication 1

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-076592

(43)Date of publication of application : 15.03.1990

(51)Int.Cl.

C12P 7/56

(21)Application number : 01-184839

(71)Applicant : RHONE-POULENC CHIM

(22)Date of filing : 19.07.1989

(72)Inventor : SCHNEIDER DIDIER
LAMONERIE HUBERT

(30)Priority

Priority number : 88 8810789

Priority date : 10.08.1988

Priority country : FR

(54) PRODUCTION OF LACTIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable the hydrolysis of starch and at the same time the economical production of lactic acid by adding an amylose-hydrolyzing saccharifying enzyme into an aqueous nutrient medium containing starch as an assimilable carbon source and fermenting the mixture with microorganism.

CONSTITUTION: Drinking water is added to a starch such as wheat flour to prepare a suspension, and the suspension is liquefied by blowing steam into it. Subsequently, the resultant liquid is placed in a fermentation tank, and this is sterilized after adding a nitrogen source such as ammonium sulfate and other nutrients. Then, at least one of saccharifying enzymes such as glucoamylase is charged into the sterilized mixture to prepare a medium. Into the aqueous medium, a cultured body of *Lactobacillus lactis* ATCC 12314, which has been inoculated into a medium such as an MRS medium, is seeded, and the mixture is fermented to produce lactic acid. After the fermentation, the produced lactic acid is recovered from a fermentation tank, and it is purified by known methods such as filtration and solvent extraction. This process enables the production of lactic acid under the saving of time with the omission of a process, in which the starch is saccharified in advance, as well as at a low cost.

[特許]2004-042464

[受付日]平成20.09.10

1/E

【書類名】 刊行物等提出書

【提出日】 平成20年 9月 8日

【あて先】 特許庁長官 鈴木 隆史 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2004- 42464

【出願公開番号】 特開2004-248673

【提出者】

【住所又は居所】 省略

【氏名又は名称】 省略

【提出する刊行物等】 刊行物 1 : 特開平 2 - 7 6 5 9 2 号 (公開日 : 平成 2 (1 9 9 0) 年 3 月 1 5 日)

【提出の理由】

【提出物件の目録】

【物件名】 刊行物 1 : 特開平 2 - 7 6 5 9 2 号

写し 1

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-76592

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)3月15日

C 12 P 7/58

6826-4B

審査請求 有 請求項の数 11 (全6頁)

⑮ 発明の名称 乳酸の製法

⑯ 特 願 平1-184839

【添付書類】

⑰ 出 願 平1(1989)7月19日

6  176

優先権主張 ⑱ 1988年8月10日 ⑲ フランス(FR) ⑳ 8810789

⑳ 発 明 者

ダイダイエ シュメダ フランス国、79500-メル、リュ エロワ リカ-

ール、7

㉑ 発 明 者

ウペール ラモ-ヌリ フランス国、79500-メル、リュ フコードリー(香

地なし)

㉒ 出 願 人

ローヌ-ブラン シミ フランス国、92403-クルボワ、ケ ボール ド

ウーメル、25

㉓ 代 理 人

弁理士 青木 朗 外4名

明 細 書

1. 発明の名称

乳酸の製法

2. 特許請求の範囲

1. 発酵可能な炭素源として発酵を含む水溶性炭素源中の微生物を使用する菌叢による乳酸の製法であって、少なくとも1つのアミロース加水分解用発酵菌を付加的に存在させて発酵を行うことを特徴とする方法。

2. 発酵を、酸化したか、または部分的に酸化した状態で使用する、請求項1記載の方法。

3. 発酵を生産物の状態で使用する、請求項1記載の方法。

4. 菌叢組成が、糖化酵素に加えて炭化酵素を含む、請求項3記載の方法。

5. 発酵が、菌叢組成に対するグルコースの重量比が0.9-18%となるのに必要な量存在する、請求項1-4のいずれかに記載の方法。

6. 糖化酵素を、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、インアミラーゼ、プルラン-

ゼおよびこれらの混合物から選ぶ、請求項1-5のいずれかに記載の方法。

7. 糖化酵素を、乾燥状態で測定した発酵1gに対して0.04-2酵素活性単位となるのに十分な量使用する、請求項1-6のいずれかに記載の方法。

8. 糖化酵素がグルコアミラーゼであり、かつ発酵に含まれる菌叢の重量に対して0.02-1%である量を使用する、請求項1-7のいずれかに記載の方法。

9. 微生物を、*Lactobacillus*属、*Streptococcus*属、*Pedococcus*属、*Bacillus*属、および*Sporolactobacillus*属に属する微生物、ならびに*Rhizopus*属に属する菌叢から選ぶ、請求項1-8のいずれかに記載の方法。

10. 菌叢をpH3.0-8.0で行う、請求項1-9のいずれかに記載の方法。

11. pHを、アルカリ金属、アルカリ土類金属またはアンモニウムの水酸化物または炭酸塩から選ぶ添加剤によって制御する、請求項1記載の方

特開平 2-76592(2)

法。

3. 発酵の詳細な説明

本発明は微生物によって脱水化合物を調製させる乳製製造の改良方法に関する。さらに、特定すれば発酵から由来する糖類の結化による微生物学的方法に関する。

適切な微生物を存在させて、糖類を調製させる有機物の合成は世界的に周知の方法である。このような微生物による調製で得られる典型的な糖としては、たとえば乳糖、乳糖、くえん酸、グルコフ、2-ケトグルコン酸、フマル酸、およびイソグルコン酸がある。これらの糖は食品、医薬品、化学製品およびその他の工業で用いられる。その例にたとえば、J. Gutcho-Hoyes Data CorporationのChemicals by Fermentation, 1973 に記載されている。

工業的調製において、低質の脱水化合物は、使用の容易さ、価格および回収率を高める可能性を同時に考慮して選択する。発酵は、容易に得られる脱水化合物として、しばしば考慮された。しかし、すべ

ての微生物は、大部分がデキストロースを代謝するに、発酵を代謝することができない。その結果、発酵は通常糖に加水分解して結化しなければならぬので、製造装置を高めている。

本発明の主要な目的は、栄養源として発酵物を用い、グルコースまたはグルコース含有の低い発酵の加水分解生成物の収率と少なくとも同等しい収率で、経済的に調製させる方法を提案することである。

微生物を使用して、発酵物を酵素的に加水分解すると同時に、発酵させて乳糖を合成できることを発見した。これによって、発酵物を予め結化する工程の省略による時間の節約の他に、調製条件のpHおよび温度が、加水分解酵素の最適活性条件と異なっている、酸の生成速度がグルコースを還元する場合に比べて顕著な差がないことは予想外なことであった。

本発明による、発酵できる炭素源として発酵物を含む水性液媒体を微生物によって調製させる乳製製造法は、少なくとも1つのアミノ酸加水分解

(3)

解酸化酵素を加えて、発酵させる。

本発明によって炭素源として使用する発酵物は、小麦、トウモロコシ、高粱、米、タピオカ、落葉、落葉のような穀類の発酵、または馬鈴薯のような根菜類の発酵でもよい。発酵物は発酵物のままか、または酸化したか、または特に結化した形で使用する。

本発明において、用語「発酵」は、生発酵の水性懸濁液、発酵の不完全な加水分解生成物、たとえば炭体化（炭体化）した発酵、発酵のシロップ、およびデキストロースを含む加水分解生成物を含む。発酵の加水分解生成物は、加水分解の程度によって多様であり、この程度はデキストロース含量、B.E. およびオリゴサッカライドおよびさらに高価なオリゴサッカライドのデキストロース含量で表される。炭体化発酵はB.E. 約3-20を示し、一般にオリゴサッカライド50-95%を含む。調製度がグルコース単位C7を超える。発酵のシロップ、またはデキストロース含量の低いグルコースのシロップは、B.E. が約20-88を示し、C7を超える

(5)

(4)

オリゴサッカライドが10-50%である。発酵の加水分解生成物またはデキストロースを含むシロップは、B.E. が90-98%に達する。発酵の加水分解生成物の製造は、結製法でよく知られている。通常炭化発酵および発酵シロップは、酸化のロアミラーゼ、時にはβミラーゼによって酸性加水分解および/または酵素加水分解によって得られる。

グルコースを含む加水分解生成物を得るには、2工程による発酵の炭化、すなわち炭化のロアミラーゼの作用、次に糖化酵素たとえばαグルコシダーゼの名でも知られているグルコアミラーゼの作用によることがもっとも多い。

本発明の方法の実施において、発酵シロップ、特に炭化された発酵物を使用することが好ましいグルコースを含む加水分解生成物の使用は、経済的見地から有利でない、それはαミログルコシダーゼの最適活性条件の50℃を超える温度、およびpH 4.5-5.5においてさえ、長時間を要する予備糖化工程を含むからである。

発酵およびその加水分解生成物は、結製しない

(6)

特開平 2-75592(3)

ます、滅菌した後に、本発明の方法に直接使用することができる。また精製され、濃縮または粉末とした市販の製品、たとえばマルトデキストリンも使用できる。

最粉は、固形物中では、グルコース分解酵素産物の質量比が約0.8〜18%となるように存在させる。生粉物は、乾燥状態として、固形物中に対して約10〜200 g/ノ、好ましくは50〜150 g/ノとする。

本発明によって、イタコン酸生産菌を含む

固形物に加える、アミロース分解酵素産物は、最粉のデキストリンをグルコースおよびマルトースに実施することができる。糖化酵素として糖化ロアミラーゼたとえば*Bacillus subtilis* var. *amylolacccharitens*、酸性アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼ、グルララーゼを挙げることができる。これらの酵素は湿粉または混合して使用することができる。

グルコアミラーゼは活性が失われているので好ましい。グルコアミラーゼはすべての活性グルコ

イラーゼ、たとえば*Aspergillus*, *Endomycetes* または *Rhizopus* とすることができる。[産業用として特許]に生菌粉を使用する場合は、糖化酵素、たとえば糖化ロアミラーゼと β -アミラーゼ、または糖化ロアミラーゼとグルコアミラーゼの混合物に加えて糖化酵素を使用することができる。[産業の工学的な製造方法は *Encycl. of Pol. Sc. Vol. 5, p46-53* に記載されている。]

アミロース加水分解糖化酵素、糖化酵素であってもよいが、これを最粉の糖化、または糖化に必要な量として固形物に加える。最少使用量は酵素の活性度、堆肥中に存在する最粉の0.8、0.8の糖化であり、熟度によって容易に決定することができる。一般的には、乾燥状態で測定した最粉1gに対して、酵素活性度0.04〜2単位、好ましくは0.1〜1単位を与えるのに十分な量を使用する。糖化酵素として *Novo Industry* が市販する発酵製品名 *AMG 200L* グルコアミラーゼは、固形物中に存在する糖化された最粉に含まれる固体の重量にもとづいて、0.02〜1%、好ましくは0.05〜

(1)

(2)

0.5%を加えることができる。

本発明の方法は、結の存在においてD-またはL-乳酸を生成できれば、どのような微生物でも使用することができる。特に *Lactobacillus* 属たとえば *delbrueckii*, *L. lactis*, *L. Leichmannii*, *L. bulgaricus*, *L. jurgens*, *L. casei*, *L. hilarius*, *L. plantarum* ; および *Streptococcus* 属たとえば *S. thermophilus*, *S. faecium* ; および *Pediococcus* 属たとえば *P. pentosaceus*、ならびに *Bacillus* 属、*Sporolactobacillus* 属および真菌たとえば *Rhizopus oryzae* を挙げることができる。

本発明で使用するアミロース分解酵素および炭素源の他に、製造環境および菌体条件を文獻の記載から選ぶことができる。便宜の製造環境はたとえば特許 *Chemicals by Fermentation* の他、多くの特許たとえば米国特許A-3 125 454、フランス特許A-1 355 547、欧州特許A-69 291、欧州特許A-12 010、欧州特許A-113 215、米国特許A-4 584 554 に記載されている。

炭素源は、同化可能な無機炭および有機化合物、

たとえば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、りん酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、トウモロコシ(C5L)および/または大豆の可溶性抽出物、炭素、ビール酵母、ペプトン、魚たんぱく分解生成物などおよびこれらの混合物を使用することができる。塩基は、無機塩類たとえばCa、Mg、Na、K、Fe、Ni、Co、Cu、Mn、Znの硫酸塩、塩化物、りん酸塩、の他に、ビタミン、または炭素の添加物、たとえば亜硝酸ナトリウムまたは炭酸ナトリウムを含むことができる。

微生物は、同様にように媒体または中間媒体として固形物堆肥中に導入する。

アミロース分解酵素は、接種直前に滅菌した堆肥に加えることができる。菌種はpH約3.0〜8.0、好ましくは5.0〜7.0、温度約20〜50℃として適宜行うが、最適条件は使用する微生物の特性は菌株によって異なる。*Lactobacillus lactis* を使用すると、pH5.5〜6.0、温度約35〜45℃で乳酸の収率を上げることができる。炭素のpHを調節する中和剤は、アルカリ金属の水酸化物または

(3)

(10)

特開平 2-76592(4)

炭酸塩、アルカリ土類金属のアンモニウム塩から選り、溶解の前、または溶解の全工程において、連続的に導入することができ、

溶解させた後、生成した乳剤を溶解液から回収し、固相の方法、たとえば濾過、蒸発、結晶化、または溶媒抽出によって分離することができ、

下記の説明は、原料から由来する炭水化物を含む増地、原料またはその加水分解生成物であるモノまたはポリサッカライドを加水分解することができる酵素を存在させて、微生物によって分解させて乳剤を製造する特殊な方法を要するものであるが、本発明の増地製造の正確な組成または特殊な製造方法を限定するものではない。

次の実施例によって本発明を例示する。

例 1

(a) 炭水化物された生菌体の製造

増地50gの増地液に、小麥粉(815 800UTS) 8.75kgを導入した。飲料水を攪拌しながら加えて全固体を20gの増地液とした。増地液は8.50、でpHを6.5に調整し、熱安定性α-ラーゼ(登録

商標 TERNANTYL 320L-RVD Industry)を含む増地(固形物3.65%を加えた)30分間攪拌を吹込んで温度100℃で増地懸濁液を炭水化物化した後、増地温度に冷却した。

(b) 増地

炭水化物した増地を含む増地液に、濃縮トウモロコシ(CSシ)の浸漬水 1.750kg、魚たんぱく加水分解生成物 0.270kg、りん酸15mlを導入した。混合時に飲料水を加えて27.1とした。この増地を攪拌し、8408でpHを5.0に調整し、1時間間隔を吹込んで100℃で滅菌した。

増地の滅菌後、濃縮カルシウム4.2kgを飲料水12.1に溶解した。この増地に原料を1時間30分吹込んで攪拌し、冷却した後、増地液に細菌培養で移した。温度を40℃に調整した。グルコアミラーゼ(登録商標ARG 200L-RVD Industry)を含む増地増地物13.6mlを導入した。この増地に、予め増地MRS(Millieu de De Man, Rogosa et Sharpe - 参照番号0881-01 de OTCO)に移植したLactobacillus lactis ATCC 12314の増地体1.7gを接種

(11)

(12)

した。増地増地は、最終的に50gとし、40℃の滅菌後の増地液で攪拌し、滅菌した。増地は45時間培養した。

D-乳酸 123.3gを寄、生産性は2.74g/g/10hであった。

比較例 2-4

例1(b)に記載するように、同一のLactobacillus lactis ATCC 12314増地物を使用した。グルコアミラーゼを存在させずに、一連の増地を行った。増地液は下記のように構成した。グルコース-水和物6.50kg(例2)、脱粉加水分解生成物8.150kg(815 800UTS市販のT4986)、乾燥状態の食品70%、D.E.約66-80(例3)、例1記載の条件で炭水化物した生菌体6.75kg(例4)。

各例において増地増地の最終体積は50gとした。増地増地および生産性を表1に示す。

各例1-4の工程において、増地増地の原料を周期的に採取して、増地増地プロファイルによって増地の量を測定した。その結果を表1のグラフに示す。曲線1-4は、増地増地中のg

(13)

(14)

/gで表わした増地の生産性を、増地増地(h)で表わした増地の増地として各例1-4について示す。

例 5-6

下記条件が異なる増地は、例1と同一の増地増地を使用し例1と同一の条件で2つの増地増地を行った。

	例 5	例 6
アミラーゼで炭水化物した原料	6.30kg	7.25kg
グルコアミラーゼ	15.0ml	16.7ml
CaCO ₃	4.0kg	4.5kg

結果は表1表に示す。

時間平 2-76592(5)

表 1 表
D-乳酸

例	培養液			グルコ アミラーゼ GSL (%)	添加成分		反応生成物	生成した 乳酸 g / l	発酵時間 (h)	生産性 g / l / h
	グルコ コース g / l	添加加水分解 生成物 g / l	菌 粉 g / l		魚たんばく加水分解生成物 g / l	魚たんばく加水分解生成物 g / l				
1			135	0.312	35	5.4	CaCO ₃	123.3	45	2.74
2	130				35	5.4	CaCO ₃	121	85	1.42
3		163			35	5.4	CaCO ₃	121.3	107	1.13
4			135		35	5.4	CaCO ₃	91.5	65	1.40
5			130	0.30	35	5.4	CaCO ₃	113	40	2.82
6			145	0.337	35	5.4	CaCO ₃	124.6	60	2.24

(1) グルコース含量 71%

(2) CSL=トウモロコシ炭出液 (炭酸トウモロコシ洗浄水)

(15)

例 7 L-乳酸の製造

例 1 記載の条件で炭化したトウモロコシ粉 7 kg を含む懸濁液に、炭酸小苏打水 1,750 kg、魚たんばく加水分解生成物 0,270 kg、りん酸 25 ml を加えた。この混合物を飲料水で 27 l に希釈して攪拌し、pH が 6.0 に調整し、蒸気を 1 時間次込んで滅菌した。

炭酸カルシウム 4.35 kg を含む滅菌水溶液 16 l を加え、温度を 40℃ に調整した。この場合にグルコアミラーゼ (登録商標 AMG 200L-WVO Industry) を含む酵素調製物 16 ml を加え、予め MRS 培地に接種した。Lactobacillus casei 170 2425 培養物 1.7 l を接種した。

発酵槽は最終的に 50 l とし、40℃ の滅菌した蒸気浴中で攪拌し、熟成した。

L-乳酸の含量は高速液体クロマトグラフィーで定期的に測定した。

発酵熟成時間 (h)	20	40	60	80	107
L-乳酸濃度 (g / l)	21	47.5	66	98	120.2

(16)

例 8-11

容量 50 l の発酵槽に菌粉 6 kg を導入した。飲料水を攪拌しながら加えて蒸気させ、全液量を 27 l とした。

菌粉懸濁液の pH を H₂SO₄ で 6.5 に調整し、これに熱安定性 α-アミラーゼ (登録商標 THERMAHL 120L-WVO Industry) を含む酵素調製物 3.25 ml を加えた。

菌粉懸濁液は次に、蒸気を 30 分間次込んで 100℃ に加熱して滅菌した。

滅菌化した菌粉懸濁液を冷却し、トウモロコシ炭出液 1,750 kg、魚たんばく加水分解生成物 0,270 kg、りん酸 25 ml を加えた。飲料水を加えて 38 l に調整し、NaOH で pH を 6.0 に調整した。

得られた溶液に、蒸気を 1 時間次込んで 100℃ で滅菌した。この工程の終りに、40℃ に冷却し、休養は 5 l であった。

この場合に、グルコアミラーゼ (登録商標 200L-WVO Industry) を含む酵素調製物 13 ml を加え、MRS 培地中に適宜接種した Lactobacillus lactis

(17)

特開平 2-76592(5)

ATCC 12314の予備培養物1.7gを接種した。

この培養物を検形し、滅菌した底液500ml中で40℃で熟成した。

造形造粒として NH_4 , NH_4OH , NaOH または KOH を例8~11にそれぞれ加えてpHを自動的に6.9に調整した。

ロー乳脂の含量を高速度液体クロマトグラフィーによって測定して、次の結果を得た。

培養熟成時間 (h)	25	50	75	85	90
ロ-乳脂濃度 (g/g)					
例8 (NH_4)	39	76	98	101.8	102.3
例9 (NH_4OH)	35	71	91	93.5	94.5
例10 (NaOH)	30	68	87	89.9	
例11 (KOH)	31	71	86	93.2	

4. 図面の簡単な説明

第1図は例1~4における熟成時間と乳脂濃度との関係を示すグラフである。

(18)

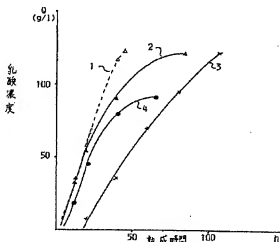


FIGURE 1